

Ergänzende Untersuchungen
zur Wirkungsweise der
Hyaluronidasehemmung durch
Glucocorticoide

von

JOHANN POULANTZAS

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Ergänzende Untersuchungen zur Wirkungsweise der
Hyaluronidasehemmung durch Glucocorticoide



Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johann Poulantzas
aus
Athen

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. W. Büngeler

Tag der Mündlichen Prüfung: 17. Juli 1958

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	13
Berechnung und statistische Auswertung	14
Diskussion	18
Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	24

Problematik

In früheren Arbeiten haben M a t h i e s ¹⁻¹² u. Mitarb. ¹³⁻²⁰ zeigen können, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung verschiedener antirheumatischer Substanzen und Behandlungsmethoden (Acetylsalicylsäure ^{3-5,13,14}, Phenylbutazon ^{6,15,16}, Chlorbenzmethoxazon ^{7,17,18}, Moorbäder ^{8-12, 19,20}) an eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark gebunden ist, wohingegen die inkretorische Funktion der Nebennierenrinde keine Rolle spielt. Es wird trotzdem unter verschiedenen Antirheumatica immer wieder eine Erhöhung der Corticoide und 17-Ketosteroidoide oder zumindest verschiedener Hormongruppen bei der fraktionierten 17-Ketosteroidbestimmung beschrieben ²¹⁻²⁸. Zusammen mit der Tatsache der hervorragenden therapeutischen Wirkung der Glucocorticoide, allerdings in Dosen, die weit über den durch andere Antirheumatica aus der Nebennierenrinde ausgeschütteten Mengen liegen ^{29,30}, wurde vielfach der nicht weiter begründete Schluß gezogen, daß die Antirheumatica ihre Wirkung auf dem Wege über eine Aktivierung der Nebennierenrinden-Funktion entfalten. Die genannten Arbeiten von M a t h i e s ¹⁻¹² u. Mitarb. ¹³⁻²⁰ haben gezeigt, daß diese Annahme zumindest für die hyaluronidasehemmende Wirkung der Antirheumatica keine Gültigkeit hat. Der Befund einer Erhöhung der 17-Ketosteroid- und Corticoid-Ausscheidung ist lediglich eine mitlaufende Reaktion in einem noch nicht restlos aufgeklärten Ablauf vegetativ-hormonell-fermentativer Vorgänge, die aber nicht mit dem hyaluronidasehemmenden Wirkungsprinzip identisch ist ¹.

Bei diesen Überlegungen ist zu bedenken, daß Hyaluronidasehemmung und rheumatherapeutischer Effekt nicht ohne weiteres gleichzusetzen sind. Dennoch scheint der Test der Hyaluronidasehemmung unter den heute bekannten experimentellen Möglichkeiten die größte Beziehung zum rheumatischen Geschehen aufzuweisen. Beim Rheumatismus wurde mehrfach eine erhöhte Hyaluronidase-Aktivität gefunden ^{29,31-44}, die durch Depolymerisation der Hyaluronsäuren und Chondroitinschwefelsäure zu einer Strukturveränderung der Zwischenzellsubstanz und damit auch zu erhöhter Permeabilität führt ⁴⁵, die als solche ebenfalls beim Rheumatismus nachgewie-

sen wurde 46-58. Die besonders auch im Blutkapillargebiet in Erscheinung tretende gesteigerte Permeabilität führt zu einem perikapillären Ödem, das zusammen mit einer gestörten Kapillardurchblutung den Sauerstoffaustausch zwischen Blut und Gewebe erschwert. Folgen dieser mangelhaften Gewebsernährung sind fibrinoide Entartung, Nekrose, Degeneration sowie die zelluläre Reaktion des Granuloms 28,29,31,39,59,60, wobei die Bilder je nach dem betroffenen Gewebe, nach der örtlichen Gefäßversorgung, dem Grad der Hypoxämie, der Größe des mangelernährten Gebietes usw. verschieden sind. Diese Überlegungen rechtfertigen die Anwendung der für die meisten Antirheumatica bereits nachgewiesenen hyaluronidasehemmenden Wirkung ¹ als experimentellen Test für Untersuchungen der Wirkungsweise dieser Stoffe und Behandlungsmethoden. Streng wissenschaftlich machen die vorliegenden Untersuchungen dennoch nur Aussagen über die Wirkungsweise der Hyaluronidasehemmung antirheumatischer Substanzen, und zu diesem Thema stellen die hier vorgelegten Untersuchungen eine Ergänzung der bisherigen Ergebnisse dar.

Im einzelnen haben die erwähnten Arbeiten von M a t h i e s ^{3,4,6,7,8,11} u. Mitarb. ^{13,15,17,19} gezeigt, daß die bei Normalratten vorhandene hyaluronidasehemmende Wirkung der geprüften Substanzen bei adrenaletomierten Ratten ausbleibt, bei hypophys-ektomierten Ratten dagegen erhalten ist. Da aber bei hypophys-ektomierten Ratten nach Untersuchungen von D o m e n j o z ⁶¹ die als Ausdruck der inkretorischen Funktion der Nebennierenrinde geltende Abnahme des Ascorbinsäure- und Cholesteringehaltes der Nebennieren unter in der Rheumatherapie üblichen Substanzen - allerdings mit Ausnahme des Cortisons - nicht eintritt, ist daraus zu schließen, daß wohl die Nebenniere, nicht aber die Aktivität der Nebennierenrinde, demnach also das Nebennierenmark für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung verantwortlich zu machen ist. Diese Annahme wurde durch weitere Untersuchungen ^{62,63} erhärtet, nach denen sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin (geprüft in Dosen von 1 γ und 6 γ /100 g Tier) bei adrenaletomierten Ratten eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung wie unter Antirheumatica bei Normal- und hypophysektomierten Tieren ergaben. Dabei wurde festgestellt, daß die Hyaluronidasehemmung nicht während der primären Katecholaminwirkung, sondern erst nach deren Abklingen in der Gegenregulationsphase sichtbar wird. Ferner konnten M a t h i e s ^{5,6,7,9,12}

u. Mitarb. 14,16,18,20 mit Hilfe einer von Br ü g g e m a n n , K a r g und K ä p p e l e r ⁶⁴ angegebenen Methode eine Katecholaminausschüttung aus der Nebenniere unter den genannten anti-rheumatischen Substanzen nachweisen. Eine weitere Versuchsreihe von M a t h i e s ⁶⁵ und S c h l i e r f ⁶⁶ beschäftigt sich mit den bei Anwendung von Glucocorticoiden vorliegenden Verhältnissen. Die Autoren hatten von vornherein nicht angenommen, daß bei Anwendung der Glucocorticoide die gleichen Verhältnisse vorliegen wie unter den anderen antirheumatisch wirksamen und hyaluronidasehemmenden Substanzen. Die Versuchsergebnisse zeigten jedoch, daß auch die Glucocorticoide ihre hyaluronidasehemmende Wirkung über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark entfalten. Die Versuchsreihen der genannten Arbeiten zeigen, daß bei Normalratten nach kurzer Anfangsphase mit einer gesteigerten Hyaluronidaseaktivität eine deutliche Hyaluronidasehemmung mit einem Maximum von 46,2% 80 Minuten nach i.v. Injektion von 2,5 mg Prednisolon/100 g Tier auftritt (Tabelle 1,2). Diese Hyaluronidasehemmung fällt bei adrenaletomierten Ratten aus (Tabelle 3,4), ist aber bei hypophysectomierten Tieren mit einer 55%igen Hemmung 80 Minuten nach Prednisolon-Injektion erhalten (Tabelle 5).

M a t h i e s ⁶⁵ und W i e s m ü l l e r ⁶⁷ haben schließlich am Beispiel des Hydrocortisons auch die unter Glucocorticoiden stattfindende Katecholaminausschüttung aus den Nebennieren feststellen können (Tabelle 6,7, Abbildung 1). Eine Ausschüttung von mindestens 6,5% Adrenalin+Noradrenalin 120 Minuten nach s.c. Injektion von 5 mg Hydrocortison/100 g Tier stellt eine Hyaluronidasehemmung nach den Untersuchungen von M a t h i e s ⁶² und S c h e u f e l e ⁶³ sicher.

In weiteren Arbeiten stellten M a t h i e s u. W a l c h e r ⁶⁸ und M a x e i n ⁶⁹ Überlegungen an, welcher Faktor am Ende der Kette der auf die Katecholaminausschüttung folgenden Gegenregulation letztlich die Hyaluronidasehemmung selbst bedingt. Es müßte eine Substanz sein, die im Körper selbst vorkommt und sowohl in vitro als auch bei adrenaletomierten Tieren in vivo eine Hyaluronidasehemmung erkennen läßt. Die genannten Autoren konnten feststellen, daß Heparin diese Voraussetzung erfüllt. Bereits 1,5 E. Heparin/100 g Ratte, die keine maßgebliche Beeinflussung der Gerinnungszeit zeigen, machen eine

Ver- suchs- reihe	N		Farb- stoff- quaddel vor 2,5 mg	Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel				
				vor P r e d n i s o l o n	0' nach	15' nach	45' nach	60' nach
							100 g Tier i.v.	
1. (Normal- tiere)	3	$\bar{x}$	119 mm ²	205 mm ²	208 mm ²	200 mm ²	235 mm ²	218 mm ²
		s ²	23	389	306	9	250	177
		s	4,8	19,7	17,5	3,0	15,8	13,3
		Hemmung			- 3,5%	5,8%	-33,8%	-15,0%
		Signi- fikanz			-	-	-	-
		p			-	-	-	-

Tabelle 1

Ver- suchs- reihe	N		Farb- stoff- quaddel vor 2,5 mg	Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel				
				vor P r e d n i s o l o n	80' nach	120' nach	160' nach	200' nach
							100 g Tier i.v.	
2. (Normal- tiere)	3	$\bar{x}$	112 mm ²	208 mm ²	164 mm ²	170 mm ²	178 mm ²	214 mm ²
		s ²	28	364	116	14	24	356
		s	5,3	19,1	10,8	3,7	4,9	18,9
		Hemmung			46,2%	39,9%	31,6%	- 6,6%
		Signi- fikanz			+	+	+	-
		p			1,0%	2,0%	5,0%	

Tabelle 2

Ver- suchs- reihe	N		Farb- stoff- quaddel vor 2,5 mg	Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel				
				vor	0' nach	15' nach	45' nach	60' nach
				P r e d n i s o l o n / 100 g Tier i.v.				
3. (adrenal- ekto- mierte Tiere)	3	$\bar{x}$	114 mm ²	199 mm ²	205 mm ²	195 mm ²	214 mm ²	197 mm ²
		s ²	44	1	120	100	133	561
		s	6,6	1,0	11,0	10,0	11,5	23,7
		Hemmung			- 7,0%	5,4%	-17,1%	2,3%
		Signi- fikanz			-	-	-	-
		p			-	-	-	-

Tabelle 3

Ver- suchs- reihe	N		Farb- stoff- quaddel	Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel			
			vor	80' nach	120' nach	160' nach	
			2,5 mg	Prednisolon	/100 g	Tier i.v.	
4. (adrenal- ekto- mierte Tiere)	4	$\bar{x}$	122 mm ²	206 mm ²	206 mm ²	207 mm ²	207 mm ²
		s ²	172	156	50	99	2
		s	13,1	12,5	7,1	9,9	1,4
		Hemmung			- 0,3%	- 0,9%	- 0,6%
		Signi- fikanz			-	-	-
		p			-	-	-

Tabelle 4

Ver- suchs- reihe	N		Farb- stoff- quaddel vor 2,5	Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel			
				vor mg	80'nach Prednisolon	120'nach /100g Tier i.v.	160'nach
5. (hypophys- ektomierte Tiere)	4	$\bar{x}$	152 mm ²	238 mm ²	227 mm ²	219 mm ²	190 mm ²
		s ²	8	285	294	579	300
		s	2,8	16,9	17,1	24,1	17,3
		Hemmung			12,5%	21,8%	55,2%
		Signi- fikanz			-	-	+
		p			-	-	1,0%

Tabelle 5

	Unbeh. Tiere	120' nach Alkohol	30' nach Hydro- cortison	60' nach Hydro- cortison	90' nach Hydro- cortison	120' nach Hydro- cortison	180' nach Hydro- cortison
Unbeh. Tiere		2,63	1,23	3,41	3,82	6,58	2,35
120' nach Alkohol	5%		1,40	0,78	1,19	3,95	0,28
30' nach Hydro- cortison	-	-		2,18	2,59	5,35	1,12
60' nach Hydro- cortison	1%	-	5%		0,41	3,17	1,06
90' nach Hydro- cortison	0,1%	-	5%	-		2,76	1,47
120' nach Hydro- cortison	0,1%	0,1%	0,1%	1%	5%		4,23
180' nach Hydro- cortison	5%	-	-	-	-	0,1%	

Tabelle 7

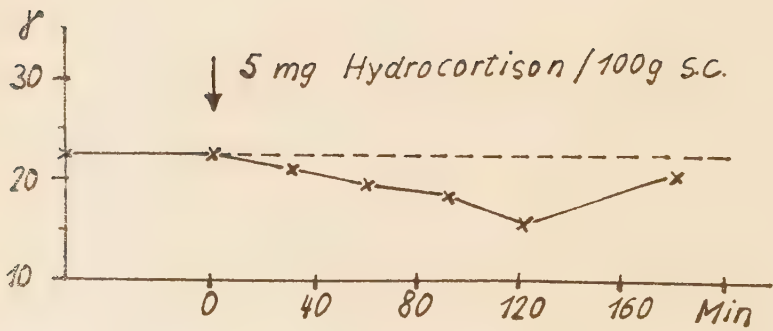


Abbildung 1

deutliche Hyaluronidasehemmung, die durch Protaminsulfat, welches Heparin inaktiviert, ausfällt.

Zweck der vorliegenden Arbeit soll es sein, zunächst die genannten Feststellungen der über eine Katecholaminausschüttung laufenden hyaluronidasehemmenden Wirkung der Corticoide durch Ausschaltung der Katecholaminwirkung durch Ergotamin zu erhärten. Zum anderen sollte untersucht werden, ob auch durch Protaminsulfat-Injektion die hyaluronidasehemmende Wirkung der Glucocorticoide blockiert werden kann. Damit könnte bei positivem Ausfall der Versuche ein Beweis für die Beteiligung des Heparins beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung erbracht werden.

Eigene Versuche

Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten nach i.v.-Injektion von 2,5 mg Prednisolon (Solu-Decortin H) /100 g Ratte ermittelt. Hierzu wurde die Bauchhaut männlicher weißer Ratten im Gewicht von 150 bis 255 g 48 Stunden vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 1%igen Verdünnung einer 6%igen Evansblau-Stammlösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidaselösung wurden in 2 ccm der oben genannten Endverdünnung der Farbstofflösung 150 I.E. Hyaluronidase (Kinetin) gelöst, so daß bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 I.E. Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken. Diese wurden durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Naturgemäß zeigt die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine weit raschere Ausbreitung als die reine Farbstoffquaddel, dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung der Ausbreitung auf, wenn eine hyaluronidasehemmende Substanz appliziert wird.

Die Versuche wurden in Narkose von 30 mg Evipan-Natrium/100 g Tier durchgeführt. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach W i l h e l m i ⁷⁰ nicht.

1. Versuchsreihe

Es wurden den Ratten vor dem Versuch die reine Farbstoff- und

die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten bestimmt. Anschließend wurden 8 mg Ergotamintrartrat (Gynergen) /100 g Tier s.c. injiziert. 30 Minuten nach der Injektion wurden 2,5 mg Prednisolon (Solu-Decortin H) i.v. in die Femoralvene appliziert und zu den Zeiten 80 und 120 Minuten nach Prednisolon-Gabe erneut je eine Farbstoff- und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und deren Ausbreitung gemessen. Beide Versuchszeiten wurden an den gleichen Tieren bestimmt. Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 8 hervor.

2. Versuchsreihe

Es wurden wiederum vor dem Versuch je eine Farbstoff- und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt, anschließend wurde die Ausbreitung gemessen. Sofort nach i.v. Injektion von 1,5 mg Protaminsulfat/Tier wurden 2,5 mg Prednisolon (Solu-Decortin H) i.v. appliziert und wiederum 80 und 120 Minuten nach der Injektion je eine Farbstoff- und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und die 10 Minuten-Ausbreitung festgehalten. Die gefundenen Einzelwerte sind aus Tabelle 9 ersichtlich.

Berechnung und statistische Auswertung

Prozentuale Berechnung

Die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität wurde zunächst in Prozenten ausgedrückt. Dieser Berechnung wurde zugrundegelegt, daß die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel vor dem Versuch (Fv) einer 100%igen Hemmung entspricht, da eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität die gleiche Größe hätte. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor dem Versuch (FHv), also ohne Einwirkung einer hyaluronidasehemmenden Substanz, entspricht einer 0%igen Hemmung, daraus läßt sich die prozentuale Hemmung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel durch das Prednisolon zu den bestimmten Zeiten nach Injektion (FHN) nach der Formel

$$(1) \quad \frac{(FHv - FHN) \cdot 100}{FHv - Fv} = \text{Hemmung in \%}$$

errechnen. Die reine Farbstoffquaddel zu den bestimmten Zeiten nach der Prednisolon-Injektion wurde gesetzt, um einen etwaigen Einfluß auf die reine Farbstoffquaddel erkennen zu können.

Statistische Auswertung

Die im Verlaufe einer Versuchsreihe an den Versuchstieren vorgenommenen Messungen hängen, abgesehen von der individuellen

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoffquaddel			Farbstoff+Hyase-Quaddel		
		vor	80'nach	120'nach	vor	80'nach	120'nach
		Prednisolon-Injektion			Prednisolon-Injektion		
1	190	150 mm ²	155 mm ²	148 mm ²	269 mm ²	269 mm ²	270 mm ²
2	150	150 mm ²	148 mm ²	162 mm ²	265 mm ²	260 mm ²	268 mm ²
3	170	167 mm ²	166 mm ²	154 mm ²	252 mm ²	256 mm ²	261 mm ²
4	200	168 mm ²	156 mm ²	170 mm ²	278 mm ²	282 mm ²	280 mm ²

Tabelle 8

(1. Versuchsreihe: 2,5 mg Prednisolon/100 g Tier
i.v. 30 Min. nach s.c. Injektion von 0,8 mg
Ergotamintartrat/100 g Tier)

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoffquaddel			Farbstoff+Hyase-Quaddel		
		vor	80'nach	120'nach	vor	80'nach	120'nach
		Prednisolon-Injektion			Prednisolon-Injektion		
5	255	120 mm ²	130 mm ²	110 mm ²	205 mm ²	218 mm ²	210 mm ²
6	215	115 mm ²	118 mm ²	110 mm ²	205 mm ²	215 mm ²	220 mm ²
7	195	130 mm ²	135 mm ²	140 mm ²	215 mm ²	220 mm ²	230 mm ²
8	185	120 mm ²	123 mm ²	116 mm ²	208 mm ²	220 mm ²	210 mm ²

Tabelle 9

(2. Versuchsreihe: 2,5 mg Prednisolon/100 g Tier
i.v. sofort nach i.v. Injektion von 1,5 mg
Protaminsulfat/Tier)

Variabilität der Versuchstiere, wesentlich ab 1) vom Typus der Quaddel (reine Farbstoff-Quaddel bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel); und 2) vom Zeitpunkt der Bestimmung im Verlaufe des Versuches. Die zum gleichen Zeitpunkt des Versuches an allen Versuchstieren vorgenommenen Messungen der Ausbreitung eines Quaddel-Typus, faßten wir als einen Versuchs-Block auf. Mittelwerte $\bar{x}$, Varianzen s^2 und Streuungen s der zu den verschiedenen Versuchs-Blöcken gehörigen Stichproben, sind in der Tabelle 10 angegeben.

Für die eigentliche statistische Analyse der Versuchsergebnisse gingen wir von der Annahme aus, die Werte innerhalb eines Versuchsblockes seien eine Stichprobe aus einer Normalverteilung (m, σ) . Den Erwartungswert m dieser Normalverteilung sahen wir als abhängig vom Typus der Quaddel und vom Zeitpunkt der Bestimmung an, und setzten dementsprechend

$$(2) \quad m = 1(Q) + b(t),$$

wobei $a(Q)$ eine nur vom Typus der Quaddel, $b(t)$ eine nur vom Zeitpunkt der Bestimmung abhängige Konstante ist.

Hinsichtlich der Varianz σ^2 der Normalverteilung innerhalb der Blöcke nahmen wir an, daß diese für alle Blöcke einer Versuchsreihe den gleichen Wert habe. Die Stichproben-Varianzen s^2 innerhalb der Blöcke sind, unter dieser Voraussetzung, Schätzwerte von σ^2 , d.h. die gemachte Annahme erfordert, daß die zu den verschiedenen Blöcken gehörigen s^2 untereinander homogen sind. Ob dieses als zutreffend angesehen werden kann, prüften wir für jede Versuchsreihe mittels des Bartlett-Testes, der folgende χ^2 -Werte ergab:

$$1. \text{ Versuchsreihe: } \chi_{\text{emp.}}^2 = 7,693$$

$$2. \text{ Versuchsreihe: } \chi_{\text{emp.}}^2 = 9,162$$

Die zugehörige Prüfverteilung ist jeweils eine χ^2 -Verteilung von $n = 5$ Freiheitsgraden, deren 10%-Sicherheitsgrenze $\chi^2 = 9,236$ in keinem Falle überschritten wird. Es besteht somit keine Veranlassung, die Annahme gleicher Varianzen innerhalb der Versuchs-Blöcke einer Versuchsreihe zu verwerfen.

Zur Prüfung der im Ansatz (2) ausgedrückten Additivität des Einflusses des Quaddel-Typus und des Zeitpunktes, führten wir eine vollständige, zweifache Varianz-Analyse durch. Die hierbei er-

		Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
		vor	80'nach	120'nach	vor	80'nach	120'nach
		2,5 mg P r e d n i s o l o n /100 g Tier i.v.					
Farbstoff- Quaddel	$\bar{x}$	159 mm ²	156 mm ²	158 mm ²	121 mm ²	126 mm ²	119 mm ²
	s ²	102	55	92	40	56	204
	s	10,1	7,4	9,6	6,3	7,5	14,3
Farbstoff+ Hyase-Quaddel	$\bar{x}$	266 mm ²	267 mm ²	270 mm ²	208 mm ²	218 mm ²	217 mm ²
	s ²	117	133	62	22	6	92
	s	10,8	11,5	7,9	4,7	2,4	9,6

Tabelle 10

mittelten Varianz-Komponenten sind in der Tabelle 11 in der üblichen Weise zusammengestellt.

Die "Wechselwirkung" drückt die Abweichung der empirischen Meßwerte von der Hypothese der Additivität aus. Ihr Vergleich mit der "Varianz innerhalb der Blöcke" mittels des F-Testes ergibt, sofern die Wechselwirkung überhaupt zahlenmäßig größer ist als diese Varianz, daß beide Varianzen wesentlich gleich sind, d.h. daß die Hypothese der Additivität nicht verworfen werden muß.

Die Additivität des Zeitfaktors besagt, daß die Farbstoff-Quaddeln und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen sich im Mittel um den gleichen Betrag ändern. Da die "Varianz zwischen den Zeitpunkten" und die "Varianz innerhalb der Blöcke", wie die Anwendung des F-Testes ergibt, nicht wesentlich voneinander verschieden sind, ist diese Änderung statistisch nicht wesentlich, d.h. der Zeitfaktor bewirkt bei keinem der beiden Quaddel-Typen eine Änderung in der Ausbreitung.

Während dieser Umstand für die Farbstoff-Quaddel eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung des Spreading-Testes zur Bestimmung der Hyaluronidasehemmung ist, bedeutet es für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, daß sie durch die jeweilige Belastung der Versuchstiere in ihrer Ausbreitung keinerlei statistisch faßbaren Änderungen unterworfen ist. Das Vorliegen einer Hyaluronidasehemmung kann somit für keine der Versuchsreihen behauptet werden.

Die oben gemachte Annahme, der Zeitfaktor wirke gleichartig auf die beiden Quaddel-Typen, ist äquivalent mit der Hypothese, es läge keine Hyaluronidase-Hemmung vor. Nur wenn eine echte, statistisch gesicherte Wechselwirkung vorgelegen hätte, wäre eine Veranlassung gegeben, diese Hypothese zu verwerfen, also das Auftreten einer Hyaluronidasehemmung als statistisch erwiesen anzusehen. Die Aussage, die Quaddeln seien zu den verschiedenen Zeitpunkten wesentlich gleich, ist somit nur in Hinblick auf die Konstanz der Farbstoff-Quaddel von Bedeutung.

Diskussion

In Tabelle 12 sind die aus der Arbeit von S c h l i e r f⁶⁶ entnommenen Werte 80 und 120 Minuten nach Prednisolon (ohne

Art der Varianz	Versuchsreihe 1			Versuchsreihe 2		
	n	SAQ	MAQ	n	SAQ	MAQ
Zwischen den Quaddel-Typen	1	72.161	72.161	1	51.245	51.245
Zwischen den Zeitpunkten	2	29	15	2	233	117
Wechselwirkung	2	16	8	2	133	67
Zwischen den Blöcken	5	72.206	14.441	5	51.611	10.322
Innerhalb der Blöcke	18	1.681	93	18	1.259	70
Gesamt-Varianz	23	73.887	3.212	23	52.870	2.299

Tabelle 11

Versuchs- reihe		Farbstoff- quaddel vor	Farbstoff+Hyase-Quaddel			Hyasehemmung (p=Irrtumswahr- scheinlichkeit)	
			vor	80'nach	120'nach	80'nach	120'nach
		P r e d n i s o l o n - I n j e k t i o n					
2,5mg Prednisolon /100 g Tier (nach Schlierf)	$\bar{x}$	112 mm ²	208 mm ²	164 mm ²	170 mm ²	46,2%	39,9%
	s ²	28	364	116	14	p=1%	1=2%
	s	5,3	19,1	10,8	3,7		
2,5mg Prednisolon /100 g Tier, dieses 30'nach 0,8mg Ergotamin /100 g Tier	$\bar{x}$	159 mm ²	266 mm ²	267 mm ²	270 mm ²		
	s ²	102	117	133	62	-0,9%	-3,7%
	s	10,1	10,8	11,5	7,9		
2,5mg Prednisolon /100 g Tier, dieses sofort nach 1,5mg Pro- taminsulfat/Tier	$\bar{x}$	121 mm ²	208 mm ²	218 mm ²	217 mm ²		
	s ²	40	22	6	92	-11,5%	-10,3%
	s	6,3	4,7	2,4	9,6		

Tabelle 12

vorherige Ergotamin- bzw. Protamin-Injektion) nochmal vergleichsweise den in dieser Arbeit ermittelten Werten gegenübergestellt. Prednisolon erzielt 80 Minuten nach Injektion eine Hyaluronidasehemmung von 46,2%, 120 Minuten nach Injektion 39,9%. Beide Werte sind statistisch mit 0,1% bzw. 1,0% Irrtumswahrscheinlichkeit gesichert. Dagegen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß nach Ergotamin die Hyaluronidasehemmung mit -0,9% (80 Minuten nach Prednisolon) bzw. -3,7% (120 Minuten nach Prednisolon) und nach Protamin mit -11,5% (80 Minuten nach Prednisolon) bzw. -10,3% (120 Minuten nach Prednisolon) ausfällt und statistisch nicht faßbar ist.

Ergotamin führt bekanntlich zu einer Wirkungsumkehr oder Unwirksamkeit des Adrenalins und wird als Sympathicolyticum bezeichnet. Die Wirkung kommt durch Lähmung der sympathischen Nervenendigungen zustande. Mathies⁶⁵ und Schlierf⁶⁶ haben zeigen können, daß die lytische Wirkung des Ergotamins auch für den noch nicht restlos geklärten Ablauf der Hyaluronidasehemmung sowohl durch Adrenalin als auch durch Noradrenalin Gültigkeit hat. In früheren Arbeiten zeigten Mathies⁶² und Scheufele⁶³, daß Adrenalin und Noradrenalin in gleichen Dosen eine Hyaluronidasehemmung annähernd gleichen Ausmaßes und gleicher Reaktionszeit hervorrufen. Die Zeit des Eintretens der Hyaluronidasehemmung ist jedoch dosisabhängig, indem geringere Dosen früher zu einer Hemmung führen, wobei allerdings eine Mindestdosis von zwischen 0,5 γ und 1,0 γ /100 g Ratte erforderlich sind. Die in dieser Dissertation mitgeteilten Ergebnisse eigener Untersuchungen bestätigen im Zusammenhang mit den referierten bereits vorliegenden Ergebnissen, daß durch eine "Blockierung" der Katecholaminwirkung die hyaluronidasehemmende Wirkung des Prednisolons ausbleibt, daß also der hyaluronidasehemmende Effekt der Glucocorticoide an eine Katecholaminwirkung bzw. an eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark gebunden ist. - Die Befunde von Domenjoz⁶¹, daß Cortison bei Normaltieren keine Ascorbinsäure- und Cholesterinabnahme in der Nebenniere zur Folge hat, bedeuten keine Einschränkung unserer Hypothese. Die Ascorbinsäure- und Cholesterindepletion gilt als Zeichen der inkretorischen Aktivität der Nebennierenrinde und zeigen demnach eine Nebennierenrindenhormon-Ausschüttung, wenn auch sicher teils in unbedeutenden Mengen, an. Diese dürfte

Folge der Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark durch die Antirheumatica sein, und ist nach den Befunden anderer Arbeiten und der eigenen Untersuchungen nur als mitlaufende und für die Hyaluronidasehemmung nicht notwendige Reaktion anzusehen. Wenn wir gesehen haben, daß auch die Glucocorticoide zu einer Katecholaminausschüttung führen, so erscheint es zunächst verwunderlich, daß nach Cortison keine Ascorbinsäure- und Cholesterindepletion der Nebenniere sichtbar wird. Dieses wird jedoch verständlich, wenn wir uns die Bremswirkung der Glucocorticoide auf das ACTH und eine weitere Corticoidausschüttung im Sinne einer Selbststeuerung vor Augen halten. Der durch die Injektion stark erhöhte Nebennierenrindenhormon-Spiegel des Blutes läßt trotz Katecholaminwirkung keine Nebennierenrindenhormon-Ausschüttung zu.

Die bereits im Kapitel "Problematik" dieser Arbeit referierten Befunde von Mathies u. Walcher⁶⁸ und Maxeiu⁶⁹ besagen, daß die bekannte inaktivierende Wirkung des Protaminsulfates auf das Heparin sich auch an der hyaluronidasehemmenden Wirkung des Heparin zeigen läßt. Wenn wir also voraussetzen, daß durch Protaminsulfat die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins blockiert wird und andererseits die hier mitgeteilten Befunde zeigen, daß die hyaluronidasehemmende Funktion eines Hydrocortison-Derivates nach vorheriger Protaminsulfat-Injektion ausfällt, so gewinnt die Annahme, daß im Ablauf des Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen - hier am Beispiel des Prednisolons - letztlich Heparin in der Gegenregulationsphase auf eine Katecholaminausschüttung aus den Mastzellen frei wird und die Hyaluronidasehemmung bedingt, weiter an Wahrscheinlichkeit. Dafür, daß die Heparinfreisetzung der Katecholaminausschüttung nachgeordnet ist, spricht die Tatsache, daß die Hyaluronidasehemmung durch Heparin auch bei adrenaletomierten Ratten deutlich wird^{68,69}. Ferner wurde bereits erwähnt, daß vom Heparin bekannt ist, daß es auch in vitro^{45,71,72} - im Gegensatz zu den Antirheumatica, die nur in vivo wirken - eine Hyaluronidasehemmung zeigt. Es ist auch erklärlich, daß mit Gerinnungstesten, wie auch Walcher u. Mathies⁷³ sie durchführten, eine Heparinausschüttung nach peroraler oder intravenöser Applikation von Prednison bzw. Prednisolon nicht faßbar ist, da die Versuche

von Mathies u. Walcher⁶⁸ und Maxe in⁶⁹ zeigten, daß weitaus geringere Dosen, als sie deutliche Gerinnungsveränderungen machen, bereits eine Hyaluronidasehemmung hervorrufen. Es wird noch von anderer Seite untersucht, ob geringere Heparindosen sogar eine stärkere Hyaluronidasehemmung zeigen als höhere. Jedenfalls dürften die hier vorgelegten eigenen Untersuchungen einige Ausblicke auf eine Beteiligung des Heparins bei der hyaluronidasehemmenden Wirkung der Glucocorticoide geben.

Zusammenfassung

Es wird mit einer Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddelmethode, die auf dem Spreading-Effekt beruht, in Rattenversuchen gezeigt, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Prednisolons als Vertreter der Nebennierenrindenhormone und ihrer Derivate ausbleibt, wenn vorher Ergotamin injiziert wurde. Im Zusammenhang mit früheren Befunden, nach denen die hyaluronidasehemmende Wirkung antirheumatischer Substanzen und auch der Glucocorticoide über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark läuft, wird diese Feststellung weiter gesichert, da vom Ergotamin bekannt ist, daß es zu einer Wirkungsumkehr oder zu einem Ausbleiben der Adrenalinwirkung führt. Aus den Ergebnissen einer weiteren Versuchsreihe ist zu ersehen, daß auch nach Protaminsulfat-Injektion die hyaluronidasehemmende Wirkung des Prednisolons ausbleibt. Auf Grund bereits vorliegender Befunde stützen die hier mitgeteilten Untersuchungen die Ansicht, daß Heparin, welches durch Protamin inaktiviert wird, über eine Katecholaminwirkung letztlich die Hyaluronidasehemmung der Corticoide und auch anderer hyaluronidasehemmender Substanzen bedingt.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Klin. 52 (1957), 1676 (dort weitere Literaturangaben)
- 2) Mathies, H.: Ärztl. Forsch. 12 (1958), I/87
- 3) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35 (1957), 892
- 4) Mathies, H.: Arzneim.Forsch. 8 (1958), 233
- 5) Mathies, H.: Med. Mschr. 11 (1957), 791
- 6) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 7) Mathies, H. u. v. Werther, G.: in Vorbereitung
- 8) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder- u. Klimahelk.: eingereicht
- 9) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder- u. Klimahelk. eingereicht
- 10) Mathies, H.: Medizinische eingereicht
- 11) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 12) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. im Druck
- 13) Jankowski, A.: Diss. München 1957
- 14) Kuepach, M.v.: Diss. München 1957
- 15) Hartmann, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 16) Biechele, I.: Diss. München in Vorbereitung
- 17) Gersson, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 18) Werther, G.v.: Diss. München 1958
- 19) Rüsck, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 20) Kaiser, I.: Diss. München 1958
- 21) Heilmeyer, L. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 75 (1950), 1124
- 22) Stötter, G.: Ärztl. Fortb. (1954), 81
- 23) Schliephake, E. u. Smets, R.: Münch. med. Wschr. 97 (1955), 56
- 24) Hiller, E.: Med. Mschr. 6 (1952), 154
- 25) Hiller, E.: Dtsch. med. Wschr. 77 (1952), 856
- 26) Fellinger, K. u. Schmid, J.: Österr. Ärztekongr. d. van Swieten-Ges., Salzburg, Sept. 1953
- 27) Cauwenberge, H. van u. Heusghem, C.: Lancet 260 (1951), 771
- 28) Leonhartsberger, F.: Münch. med. Wschr. 96 (1954), 987 u. 1039
- 29) Terbrüggen, A.: Dtsch. med. J. 5 (1954), 312
- 30) Fellinger, K. u. Schmid, J.: Med. Klin. 48 (1953), 949
- 31) Terbrüggen, A.: Ärztl. Prax. 6 (1954), 40
- 32) Abrahams, G. u. Glynn, J.: Clin. Sci. 8 (1949), 171
- 33) Evers, A.: zit. Schliephake u. Smets (23)
- 34) Glick, D. u. Sylven, B.: Science 113 (1951), 388
- 35) Faerra, F.: Science 103 (1946) 696
- 36) Hartmann u. Matijevic: Zschr. f. Rheumaforsch. 11 (1952), 23
- 37) Jahnke: Ärztl. Wschr. 6 (1951), 1153

- 38) Klemperer, A.: Amer. J. Med. 10 (1951), 405
- 39) Meyer, K.: Physiol. Rev. 27 (1947), 335
- 40) Rimington, C.: Ann. Rheumat. Dis. 8 (1949), 34
- 41) Seifter, J. u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Med. Biol. 72 (1949), 277
- 42) Schoen, R.: Dtsch. med. Wschr. 77 (1952), 558
- 43) Stepantschitz, G.: Österr. Ärztekongr. d. van Swieten-Ges. Salzburg Sept. 1953
- 44) Stepantschitz, G. u. Kresbach, E.: Zschr. Rheumaforsch. 13 (1954), 266
- 45) Gibian, H.: Angew. Chemie 63 (1951), 105 (dort weitere Lit.)
- 46) Armentano, L. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 62 (1936), 1325
- 47) Astapenko, M.G.: Ter. Arch. 22 (1950), 69
- 48) Brown, E.E. u. Wasson, V.P.: Pediatr. St. Louis 18 (1941), 328
- 49) Epstein, E.L. u. Greenspan, E.B.: Arch. Int. Med. Chicago (1941), 1077
- 50) Gil, J.R. u. Guerra, F.: Arch. inst. cardiol. Mex. 17 (1947), 733
- 51) Jaworski, A.A. u. Mitarb.: J. Pediatr. 37 (1950), 697
- 52) Ratschow, M.: Ther. Gegenw. 90 (1951), 129
- 53) Schmidt, H. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 75 (1950), 790
- 54) Schoen, R.: 9. Fortb.-Kurs, Regensburg, Okt. 1952
- 55) Warter, O.J. u. Mitarb.: Delaware Med. J. 30 (1948), 41
- 56) Klose, W.: Zschr. Rheumafor. 12 (1953), 136
- 57) Störmer, A.: Medizinische (1953), 703 u. 739
- 58) Eppinger, H.: Klin. u. Path. d. Permeabilitätsstörungen, Wien 1944
- 59) Klinge, F.: zit. Schoen, R. Ärztl. Fortb. (1954), 1
- 60) Vierling, R.: Diss. München 1953
- 61) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 (1955), 14
- 62) Mathies, H.: Klin. Wschr. eingereicht
- 63) Scheufele, R.: Diss. München 1958
- 64) Brüggemann, J., Karg, H. u. Käppeler, O.: Vitamine u. Hormone 7 (1956), 200
- 65) Mathies, H.: Zschr. f. ges. exper. Med. eingereicht
- 66) Schlierf, G.: Diss. München in Vorbereitung
- 67) Wiesmüller, J.: Diss. München in Vorbereitung
- 68) Mathies, H. u. Walcher, A.: in Vorbereitung
- 69) Maxein, H.: Diss. München in Vorbereitung
- 70) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz (61)
- 71) Pantlitschko, M. u. Kaiser, E.: Biochem. Zschr. 322 (1951) 137
- 72) Caneghem, P. van, Marx, R. u. Spier, H.W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 227 (1955), 149
- 73) Walcher, A. u. Mathies, H.: in Vorbereitung

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen dankbar.

Ich wurde am 8. März 1932 in Pyrgos (Griechenland) geboren, besuchte in Pyrgos die Volksschule, danach das 8. Realgymnasium in Athen und bestand im Juli 1950 die Reifeprüfung.

Im März 1951 habe ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Lausanne begonnen. Nach dem 4. Semester legte ich am 30. März 1953 die Naturwissenschaftliche Prüfung ab, und nach dem 7. Semester schloß ich mein vor-klinisches Studium mit der ärztlichen Vorprüfung an der Universität Lausanne ab.

Nach einem weiteren Semester an der dortigen Universität setzte ich mein Studium am 15. März 1955 an der Universität Wien fort, wo ich 3 Semester studierte und 2 Monate als Famulus an der II. Medizinischen Klinik arbeitete.

Im November 1956 schrieb ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität München ein und beendete dort nach 2 Semestern mein medizinisches Studium mit der ärztlichen Prüfung am 30. April 1958. Als Famulus habe ich im Städtischen Krankenhaus Passau 1 1/2 Monate an der Chirurgischen Abteilung gearbeitet.

Seit Winter 1958 war ich an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik München mit der Bearbeitung meines Promotionsthemas beschäftigt.

